

0-734574



УДК 579.22:577.1

На правах рукописи

ФИШМАН Роман Александрович

**ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА ФЕНИЛАЛАНИЛ-ТРНК-  
СИНТЕТАЗЫ ИЗ *Thermusthermophilus* В КОМПЛЕКСЕ  
С ФУНКЦИОНАЛЬНЫМ ЛИГАНДОМ**

Специальность:

03.00.07 - Микробиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Казань - 2003

Работа выполнена на кафедре микробиологии Казанского государственного университета и кафедре структурной биологии Института Вайцмана (г. Реховот, Израиль). Отдельные фрагменты работы выполнены также в лаборатории Национального синхротронного источника излучения (Аптон, Нью-Йорк, США).

Научные руководители:

доктор биологических наук,  
профессор О. Н. Ильинская

доктор физико-математических наук,  
профессор М. Сафро

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,  
профессор Коксин В.П.

доктор биологических наук,  
профессор Мелентьев А.И.

Ведущая организация:

Институт молекулярной биологии  
РАН, г.Москва

Защита состоится «29» 05 2003 г. в 12<sup>00</sup> на заседании

Диссертационного совета Д.212.081.08 при Казанском государственном университете им.Ульянова-Ленина, 420008, г.Казань, ул. Кремлевская, д. 18.

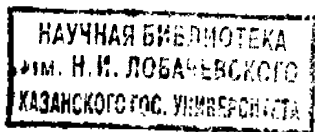
С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке имени Н. И. Лобачевского Казанского государственного университета.

Автореферат разослан «29» 05 \_\_\_\_\_ 2003 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
к.б.н., доцент

Аскарова А.Н.

*Аскарова*



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность** темы. Трансляция генетического кода является одним из определяющих свойств живых систем, и эта функция во многом базируется на небольшом семействе ферментов - **аминоацил-тРНК-синтетаз** (aaRS). Современные исследования продемонстрировали способность **рибосомальной** РНК самостоятельно проводить целый ряд химических реакций, которые прежде считались прерогативой белков, в том числе включение аминокислот в аминокацил-тРНК и гидролиз ее аналогов, что еще более подчеркивает важную роль этих ферментов. После образования молекулы аминокацил-тРНК специфичность белкового синтеза во многом зависит от комплементарных взаимодействий между парами оснований, и дальнейший химический катализ может быть осуществлен представителями «мира РНК». Однако специфичность самого синтеза аминокацил-тРНК требует участия белков. Эта специфичность настолько высока, что примерно на 10 000 верных реакций **аминоацилирования** происходит лишь одна ошибочная. Реакция базируется на стереоспецифическом узнавании между синтетазой, аминокислотой и тРНК в ходе **двухстадийного** процесса аминокацилирования:

1.  $aaRS + aa + ATP \rightarrow aaRS(aa-AMP) + PPi$
2.  $aaRS(aa-AMP) + tRNA \leftrightarrow aaRS + aa-tRNA + AMP$

Понимание структуры и механизма функционирования этих ферментов может дать ответы на многие из важных вопросов, стоящих перед молекулярной биологией. А благодаря центральной роли aaRS в трансляции генетического кода, эволюцию синтетаз и их тРНК необходимо рассматривать в тесной связи с проблемой происхождения жизни.

Каждый белок специфичен для одной определенной аминокислоты и одной или нескольких **изоакцепторных** тРНК. В настоящее время четко определены основные взаимосвязи внутри семейства аминокацил-тРНК-

синтетаз. Сравнение их структур на различных уровнях - от первичной до третичной - позволяет разделить семейство на два класса, внутри которых различают 7 подклассов. Важнейшим различием ферментов двух классов является конечная точка **аминоацилирования** на 3'-концевом аденозине тРНК: **синтетазы** класса I производят присоединение по 2'-гидроксильной группе **рибозы**, тогда как синтетазы класса II переносят аминоксил-аденилат на 3'-гидроксил. Разделение на два класса подтверждается и результатами кристаллографических исследований, показавших две различных архитектуры активных сайтов, которая остается постоянной среди практически всех членов одного класса. В активных сайтах синтетаз обнаружены высоко консервативные аминокислотные последовательности, и их важность подтверждена кинетическими исследованиями **мутантных** ферментов.

Механизм аминоацилирования является столь сложным, поскольку специфичное узнавание родственной тРНК включает в себя конформационные перестройки как самой синтетазы, так и тРНК, происходящие в ходе связывания и переноса аминоксил-аденилата. Хотя большинство из определенных на настоящий день структур показывают важность взаимодействия с **антикодоновым** триплетом тРНК для точного ее узнавания, различные aaRS вовлекают во взаимодействие и иные сайты тРНК, изменяющиеся от фермента к ферменту. Видимо, тРНК-связывающие домены более подвержены эволюционным изменениям, нежели каталитические, то есть, две каталитические функции синтетаз - активация аминокислоты и перенос аминоксил-аденилата на молекулу тРНК - эволюционировали и развивались в значительной мере независимо друг от друга.

**Фенилаланил-тРНК-синтетаза** — наиболее крупный и сложный фермент группы, принадлежащий ко II классу и обычно выделяемый в отдельный подкласс d. Его субъединичная организация  $(\alpha\beta)_2$  была установлена для

белка, выделенного из *Thermus thermophilus* HB8. Каталитический домен, характерный для **синтетаз** II класса, входит в состав  **$\alpha$ -субъединицы** (350 аминокислотных остатков), а более крупная  **$\beta$ -субъединица** (785 аминокислотных остатков) включает, помимо прочих, **домен**, структурно весьма схожий с каталитическим, но не обладающий каталитической активностью. Наряду с этим,  **$\beta$ -субъединица** включает и другие элементы, в том числе **олигонуклеотид-связывающий домен** и **рибонуклеопротеидный домен**. Структура **PheRS** в комплексе с **tRNKPhe** установлена при низком разрешении. В ходе анализа этих структурных данных был продемонстрирован необычный способ связывания tРНК, в котором принимают участие одновременно оба **гетеродимера** белка.

Вообще, три аспекта изучения **аминоацил-tРНК-синтетаз** представляют особый интерес. Это - механизмы специфического узнавания и активации соответствующей аминокислоты, узнавание и **аминоацилирование** tРНК и, наконец, эволюция и дивергенция 20 **молекул-синтетаз** от древних предшественников. Ответы на эти вопросы способна дать атомная структура как самих синтетаз, так и их комплексов с функциональными субстратами.

**Цель исследования.** Цель исследования - установить пространственную структуру фенилаланил-tРНК-синтетазы в комплексе с функциональным лигандом - **фенилаланил-аденилатом** - и выявить молекулярные механизмы, лежащие в основе распознавания субстратов и прохождения первого этапа реакции аминоацилирования.

**Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:**

1. Найти способ преодоления невозможности протекания реакции аминоацилирования в кристаллах **нативной** фенилаланил-tРНК-синтетазы, что связано с присутствием в маточном буфере высокой концентрации соли

**аммония**, с одной стороны необходимого для стабилизации **кристаллов**, а с другой - **ингибирующего** строго необходимого для реакции взаимодействие с ионами магния.

2. Проведя первую стадию реакции в кристаллах **нативной фенилаланил-тРНК-синтетазы**, установить пространственную структуру образовавшегося комплекса при **возможно** большем разрешении.

На основе полученных данных, а также результатов предыдущих исследований установить молекулярные механизмы, лежащие в основе первой фазы катализируемой реакции, объяснить роль в них катионов  $Mg^{2+}$ , а также обосновать высокую специфичность распознавания субстратов первой фазы реакции - молекул АТФ и **фенилаланина**.

**Научная новизна.** В ходе работы доказана возможность успешного прохождения реакции аминокислотилирования в присутствии ионов  $Mn^{2+}$ , а также установлена структура **фенилаланил-тРНК-синтетазы** в комплексе с **фенилаланил-аденилатом**, продуктом первой стадии катализируемой этим ферментом реакции. Структура получена при высоком разрешении 2.6 Å, что позволило установить механизмы, лежащие в основе высокоспецифического распознавания белком субстратов - АТФ и фенилаланина.

Выявлено присутствие в структуре катионов  $Mn^{2+}$  и анионов  $SO_4^{2-}$ , выдвинута гипотеза об их роли в функционировании **фенилаланиновой** системы, стабилизации пространственной структуры гетеродимерного белка и, возможно, специфическом связывании с ДНК.

На основе структурных данных установлена молекулярная схема прохождения первой стадии реакции аминокислотилирования.

**Практическая значимость.** Большой практической значимостью обладают исследования механизмов всех этапов синтеза белка, а также структуры и молекулярных принципов функционирования вовлеченных в этот процесс ферментов. Результаты подобных работ не только способствуют

более глубокому пониманию одного из наиболее фундаментальных жизненных процессов, но и помогают модулировать его, создавать антибиотики, специфически **ингибирующие** белковый синтез. Многообразие функций **аминоацил-тРНК-синтетаз** - в том числе, **регуляторных**, - позволяет говорить и о возможности использования их в решении самых разнообразных задач, связанных с необходимостью регуляции внутриклеточного метаболизма. С другой стороны, отсутствие четких знаний о структуре, механизмах регуляции и функционирования этих ферментов не позволяют пока активно использовать эти возможности в медицинских целях. Особый интерес при этом представляет собой **фенилаланил-тРНК-синтетаза**, один из наиболее крупных и сложных **ферментов** данного класса, для которого продемонстрировано специфическое связывание с определенными участками ДНК, расположенными в районе **5'-конца** гена **pheST**, кодирующего этот белок, осуществляя авторегуляцию транскрипции. Некоторые данные говорят и в пользу возможности участия этого белка в раковых процессах, что еще более повышает значение детального изучения механизмов, лежащих в основе функционирования этого фермента. В связи с этим, целью настоящей работы явилось установление пространственной структуры комплекса **фенилаланил-тРНК-синтетазы** с продуктом первой стадии катализируемой ею реакции - **фенилаланил-аденилатом**. На основе полученных результатов мы показали наиболее вероятный механизм специфического распознавания субстратов, АТФ и **фенилаланина**, а также прохождения первого этапа реакции **аминоацилирования**.

Работа выполнена в рамках темы «Биосинтез, биогенез, классификация, физиологические функции новых микробных ферментов и возможные области их практического применения» (номер гос. **рег.** 01.2.00.104982).

**Апробация работы.** Основные результаты работы доложены на II и IV научных конференциях молодых ученых, аспирантов и студентов «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2001, 2003), на III съезде биохимического общества (Санкт-Петербург, 2002), на отчетных научно-практических конференциях кафедры Структурной биологии университета Вайцмана (Реховот, Израиль, 2000, 2001).

**Публикации.** По теме настоящей диссертации опубликовано 4 научных работы. Из них две - в зарубежной печати и две в сборниках тезисов докладов российской и региональной конференций.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 98 страницах машинописного текста, содержит 4 таблицы, 14 рисунков, включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, их результаты, обсуждение результатов, выводы и список литературы. Список литературы содержит 135 источников, из них 132 зарубежных.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Биомассу экстремально термофильных *Thermusthermophilus HB8* растили при температуре 75° С и интенсивной аэрации (~1,5 л/мин) до достижения оптической плотности  $OD_{550} = 1.5$ . Клетки отделяли центрифугированием; получившуюся биомассу хранили при -80° С. Выделение фенилаланил-тРНК-синтетазы проводили с применением гель-фильтрации, ионообменной и гидрофобной хроматографии. Фермент обнаруживали в реакции аминокислотирования с использованием радиоактивно меченого фенилаланина ( $Phe^* [^{14}C]$ ). Полученный белок хранили при -20° С. Перед кристаллизацией диализовали при 4° С в течение ночи против кристаллизационного буфера, содержащего 20mM Imidazole-HCl (pH 7,8), 1mM  $MgCl_2$ , 1mM  $NaNa_3$ .



Раствор белка собирали и осаждали в течение 8 часов при 4° С в 80 % нас. сульфате аммония. Для отделения осевшего фермента центрифугировали 45 минут (-20 000 g, 4° С). Удаляли супернатант, белковый осадок растворяли и **диализовали** в течение ночи при 4° С против кристаллизационного буфера с 10 % сульфата аммония. Центрифугированием удаляли микрочастицы.

Процедуру кристаллизации проводили методом «висячей капли», уравновешенной против 27 % (по нас.) раствора сульфата аммония в кристаллизационном буфере. Для получения кристаллов комплекса белка с **фенилаланиладенилатом (Phe-AMP)** непосредственно перед помещением в пучок рентгеновских лучей кристаллы синтетазы вымачивали в течение 30 минут в растворе, содержавшем АТФ (2,5mM), Phe (2,5mM) и  $MnSO_4$  (2,5mM).

Данные рентгеновской дифракции на кристаллах нативной синтетазы и комплекса PheRS-Phe-AMP снимались при 0,98 Å на синхротроне BNSLS. Расстояние до детектора составляло 120 мм; для каждого набора дифракционных данных использовался единственный кристалл, мгновенно замороженный до 120±2 К. Предварительно кристаллы помещались в **криозащитный** раствор, содержащий 30 % (по объему) глицерина. Сбор данных производился на детекторе Brandeis CCD-based, установленном под пучком X12C. Первый набор снимался с кристаллов **нативного** белка до разрешения 2,8 Å. В общей сложности с кристалла было снято 60 рамок дифракционных данных, при осцилляции 1° и времени экспозиции 120 секунд для каждой рамки. Второй набор (60 рамок) собирался с кристалла комплекса до разрешения 2,6 Å, при неизменных осцилляции и времени **экспозиции**. Собранные данные подвергали первичной обработке и затем шкалировали. Статистика собранной дифракционной информации суммируется в Таблице 1.

В качестве стартовой модели использовалась пространственная структура нативной синтетазы, уточненная до разрешения 2.8 Å. Первоначальную

модель уточняли по методу твердого тела, используя данные, собранные с кристаллов **нативного** белка при 100 К и разрешении 20,0-2,8 Å. Начальный **R-фактор** в 44,3 % был снижен до 34,4 % уже после первого цикла уточнения. Затем проводили несколько циклов уточнения картезианских координат по методу минимизации свободной энергии, а также симуляции плавления, сопровождая каждый цикл ручной подстройкой модели. Эти шаги привели к быстрому снижению R-фактора и **Rсвоб.** до 26,5 % и 31,0 %. На этом этапе случайный набор из 10 % общего числа отражений был исключен из расчетов уточнения и использовался в качестве контрольного, для расчета **Rсвоб.**

Таблица 1. Статистика сбора данных и уточнения пространственной модели

|   | <b>Нативная PheRS</b>    | <b>PheRS-Phe-AMP</b>                             |
|---|--------------------------|--|
| Сбор данных                               |                          |  |
| Пространственная группа                   | P3221                    | P3221  |
| Параметры ячейки (Å)                      | a = b = 173,3; c = 138,4 | a = b = 173,6; c = 138,3                         |
| Разрешение (Å)                            | 50,0 – 2,8               | 50,0 – 2,6                                       |
| <b>R<sub>merge</sub></b> (%)              | 7,2                      | 7,6  |
| Избыточность набора (%)                   | 5,2                      | 5,3  |
| Полнота набора (последняя оболочка) (%)   | 97,6 (72,2)              | 94,7 (81,7)                                      |
| Общее число отражений                     | 307 582                  | 405 589  |
| Уникальных отражений                      | 59 314                   | 75 189   |
| Уточнение модели                          |                          |  |
| Число атомов                              | 8 250                    | 8 284  |
| Число молекул воды                        |                          | 289  |
| Ионы                                      | Mn <sup>2+</sup>         | Mn <sup>2+</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> |
| R-фактор (%)                              |                          | 21,6   |
| R-фактор своб. (%)                        |                          | 25,8   |
| Средний <b>В-фактор</b> (Å <sup>2</sup> ) |                          | 45,2   |
| R.m.s. связей (Å)                         |                          | 0,011  |
| R.m.s. углов (О)                          |                          | 1,76   |

Дополнительно проводили уточнение по методам минимизации групповых **В-факторов** и минимизации энергии, что снизило значения R-фактора и

**Рсвоб.** до значений в 23,9 % и 29,2 %. Финальная модель апофермента использовалась в качестве стартовой при расчете структуры комплекса.

Первоначальная карта электронной плотности (**Ғнабл.** - **Ғрасч.**) и (**2Ғнабл.** - **Ғрасч.**) рассчитывалась, как и все последующие расчеты, при разрешении 50,0-2,6 Å. Уже первая карта продемонстрировала присутствие лиганда в активном сайте, а также весьма сильный (более 10σ) пик, соответствующий иону **Mn<sup>2+</sup>**, связанному на межсубъединичной αβ поверхности.

Модель лиганда Phe-AMP была помещена в активный центр и подстроена под максимальное соответствие электронной плотности. Первоначальные значения **Р-фактора** и **Рсвоб.** для комплекса составили 30,1 % и 31,7 %, соответственно. После первого цикла уточнения и ручной подстройки модели значения **Р-фактора** и **Рсвоб.** снизились, соответственно, до 23,8 % и 27,0 %.

Затем в расчет были включены молекулы воды, находившиеся от поверхности белка на расстоянии водородных связей, в пиках электронной плотности не менее 3σ. Всего таким образом было включено 290 молекул растворителя. После этого проводили несколько циклов уточнения индивидуальных **В-факторов**, сопровождавшихся ручной подстройкой модели.

Для локализации ионов металла была рассчитана аномальная разностная карта электронной плотности, которая должна показать положение иона марганца в структуре. Расчет показал высокий и четкий (>8σ) пик электронной плотности катиона, связанного у интерфейса взаимодействия α- и р-субъединиц, поблизости от активного центра фермента. Внутри же самого активного центра аномальной электронной плотности обнаружено не было.

Уточнение модели комплекса было закончено при значениях **Р-фактора** и **Рсвоб.** в 21,6 % и 25,8 %, соответственно, и строгом соблюдении требований стереохимии. Статистика уточнения модели приведена в Таблице 1.

Анализ геометрии установленной структуры показал, что лишь одно значение углов  $\Phi$  и  $\Psi$  из всех неглициновых аминокислот лежит в невыгодной (но не запрещенной) области диаграммы **Рамачандрана**. Соответствующий Glup579 вовлечен в образование  $\gamma$ -петли из трех аминокислот, и необычный торзионный угол обусловлен резким изгибом основной цепи. Финальная модель включала в себя 8 249 атомов (без учета атомов водорода), входящих в структуру **фенилаланил-тРНК-синтетазы**, 34 атома в структуре лиганда (без водородов), 289 молекул воды, один ион сульфата и один катион  $Mn^{2+}$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Кристаллы появлялись в течение 4-6 **недель**, достигая максимальных линейных размеров 0,4 x 0,4 x 0,3 мм, и принадлежали к пространственной группе **P3<sub>2</sub>21**.

Основной проблемой в получении функционального комплекса **синтетазы** с Phe-AMP была строгая необходимость присутствия в реакционной среде иона магния, стабилизирующего положение АТФ в активном центре. Но связывание его в активном центре белка **ингибируется** сульфатом аммония, присутствующим в качестве **преципитанта**, и понижение концентрации которого неизбежно привело бы к растворению кристаллов белка. **Ингибирование** оказывается практически полным, что приводит к невозможности связывания АТФ и, следовательно, отсутствию образования комплекса. Для того чтобы убедиться, что марганец может эффективно заменять магний в реакции аминоацилирования, катализируемой PheRS из *Th. thermophilus*, исследовали каталитическая активность фермента, измеряя уровень аминоацилирования тотальной tRNA<sup>Phe</sup>, выделенной из *E. coli*, L-[<sup>14</sup>C]-фенилаланином в присутствии АТФ и марганца, а также магния в качестве контрольного варианта. Результаты, приведенные на рисунке 1,

демонстрируют, что **фенилаланил-тРНК-синтетаза** способна эффективно проводить **аминоацилирование** в присутствии  $Mn^{2+}$ . Несмотря на более низкую, по сравнению с магнием, активность этих катионов, присутствие сульфата в реакционной смеси на ход реакции практически не влияет.

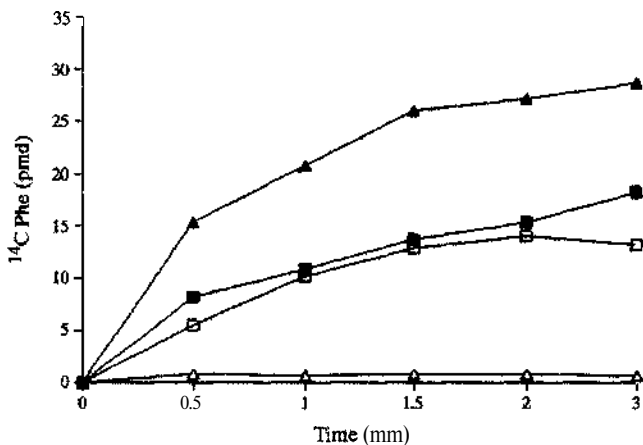


Рис. 1. Влияние дивалентных катионов на реакцию **аминоацилирования** в присутствии  $(NH_4)_2SO_4$

Измерения проводились при  $25 \pm 2^\circ C$ . ▲ - 9mM  $MgCl_2$ ; Д - 9mM  $MgCl_2$ , 35 % (нас.)  $(NH_4)_2SO_4$  ■ - 9mM  $MnCl_2$ ; а - 9mM  $MnCl_2$ , 35 % (нас.)  $(NH_4)_2SO_4$ .

Таким образом, стало возможным проведение первого этапа реакции аминоацилирования на кристаллах PheRS. Успешное завершение реакции позволило получить функциональный комплекс **PheRS-PheAMP** в кристаллическом виде, и собрать **рентгеноструктурные** данные для установления его структуры. Пространственная структура **фенилаланил-тРНК-синтетазы** в комплексе с продуктом первой стадии реакции аминоацилирования, **фенилаланил-аденилатом**, была установлена до разрешения 2.6 Å. Разностная карта Фурье ясно продемонстрировала область

положительной электронной плотности, которая может быть отнесена к молекуле аденилата, Phe-AMP, связанной в активном сайте (см. Рис. 2). Эти данные также дополнительно свидетельствуют о том, что PheRS проявляет функциональную активность в кристаллах и в присутствии  $Mn^{2+}$ .

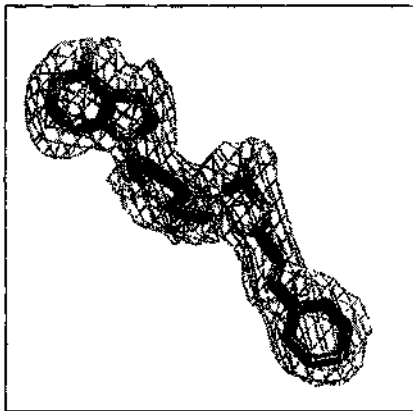


Рис. 2. Фрагмент карты электронной плотности и вписанная в него модель Phe-AMP

*Расчет карты ( $2F_{\text{набл}} - F_{\text{расч}}$ ) проводился при разрешении от 50 до  $2,6 \text{ \AA}$  на модели PheRS-Phe-AMP. Рисунок отображает пики плотности выше  $1 \sigma$ .*

На карте электронной плотности были идентифицированы 290 молекул воды. При этом одна из них обладала чрезвычайно низким В-фактором ( $3 \text{ \AA}^2$ ) и, вдобавок, демонстрировала на карте электронной плотности очень ярко выраженный пик ( $\sim 7 \sigma$ ). Эта молекула расположена на поверхности домена В5  $\beta$ -субъединицы, в области внутримолекулярной оси симметрии второго порядка. Положение ее жестко координируется аргининами Arg $\beta$ 407 и Arg $\beta$ 413. Значительный размер этого пика, его почти точная сферическая форма и геометрия взаимодействий с гуанидиновыми группами боковых

цепей двух аргининов - все это позволило соотнести его с ионом сульфата, присутствующего в растворе (см. ниже).

Область активного центра сформирована большей частью шестью антипараллельными цепями и одной параллельной, вместе образующими р-слой, который увязывается воедино с помощью нескольких ос-спиралей и петель. Все **конформационные** изменения, обнаруженные в структуре активного сайта при формировании комплекса, в целом можно охарактеризовать как смещение по направлению к месту связывания Phe-AMP. К примеру, образованная аминокислотами мотива 2 петля по сравнению со структурой **нативного** фермента смещена на 1,1 Å по направлению к **адениновой** части связанного в активном центре субстрата.

Важным свойством активного центра PheRS является наличие глубокого **фенилаланин-связывающего** «пакета». Нижняя его поверхность параллельна фенольному кольцу субстрата и состоит из набора абсолютно консервативных остатков глицина (аминокислоты 282, 284, 312, 316 и 318), оставляя достаточно места для связывания **фенилаланина** и АТФ. Верхняя поверхность «пакета» и одна из его стенок образованы исключительно гидрофобными аминокислотами: Phe $\alpha$ 258, Phe $\alpha$ 260, Val $\alpha$ 261 и Ile $\alpha$ 139, противоположная же стенка состоит из аминокислот, способных принимать участие в электростатических взаимодействиях и формировании водородных связей: Glu $\alpha$ 220, Ser $\alpha$ 180, His $\alpha$ 178, Gln $\alpha$ 218. Анизотропия расположения аминокислот, образующих **фенилаланил-связывающий** «пакет», обуславливает ориентацию карбонильной и аминогрупп связанного Phe-AMP.

Специфическое распознавание фенилаланина происходит благодаря сети взаимодействий, в которых фенольное кольцо субстрата, с одной стороны, и два близлежащих **фенольных** кольца аминокислот Phe $\alpha$ 258 и Phe $\alpha$ 260 из

мотива 3 – с другой, формируют координационный центроид из трех пар ароматических колец, связанных взаимодействиями «ребро - плоскость».

Центр ароматического кольца лиганда располагается на расстоянии 4,6 Å от центра кольца **Pheα258**. Дистанция до центра кольца **Pheα260** составляет 5,2 Å, а расстояние между кольцами **Pheα258** и **Pheα260** - 5,9 Å. Эти значения находятся неподалеку от средней величины в 5,5 Å, которая характерна для ароматических центроидов в белках. Образованные плоскостями колец углы близки к 90°. Интересно отметить, что активный центр PheRS содержит целую сеть межароматических взаимодействий, в которую вовлечены 6 аминокислот: **Pheα258 → Pheα260 → Trpα149 → Pheα134 → Trpα153**.

Связывание аминогруппы субстрата достигается также за счет взаимодействий с **Serα180**, **Hisα178** и молекулой воды S9. Посредством воды S9 аминогруппа связывается с расположенными чуть дальше **Gluα220**, **Glnα218** и **Thrα178**. Месторасположение **Glnα218** благоприятствует образованию водородной связи с кислородами **рибозы O4' и O5'**.

PheRS при образовании комплекса с **Phe-AMP** претерпевает не слишком сильные **конформационные** перестройки в районе консервативного мотива 2. Вся электронная плотность, окружающая связанный интермедиат **Phe-AMP** хорошо упорядочена на картах плотности и свободного фермента, и комплекса с **Phe-AMP**. Вытянутая **конформация Argα204** ясно наблюдается на карте, что говорит о возможности образования контактов **его** боковой цепи одновременно с **α-фосфатом** и карбонильным кислородом субстрата. При сравнении со структурой **нативной** PheRS видно, что боковая цепь аргинина смещается со своего первоначального положения в сторону субстрата. В то же время, с противоположной стороны субстрата молекула воды S290 опосредует связь фосфатного кислорода **Phe-AMP** и карбонильного кислорода



основной цепи Met $\alpha$ 48, заметно усиливая взаимодействие. Таким образом, две области активного сайта белка «стягиваются» за счет взаимодействий фосфата и **рибозы** с Arg $\alpha$ 204 и Glu $\alpha$ 218, с одной стороны, и (посредством воды S290) с карбонильным кислородом из Met $\alpha$ 148 - с другой. Рибозная часть аденилата фиксируется взаимодействиями с Glu $\alpha$ 218 и водой S208, которая образует водородные связи с 2'-ОН и NH<sub>2</sub>-группой Arg $\alpha$ 321. Вода S154 опосредует взаимодействие 3'-ОН группы рибозы с боковой цепью строго консервативного аминокислотного остатка Glu $\alpha$ 279.

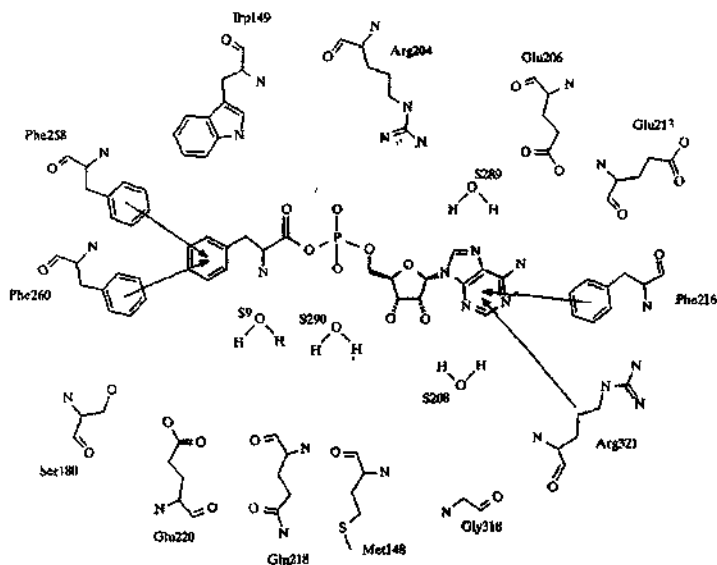


Рис. 3 Схематическое изображение важнейших связей между **Phe-AMP** и аминокислотами активного сайта PheRS

Связывание аденозиновой части фенилаланил-аденилата обусловлено аминокислотами Phe $\alpha$ 216 и Arg $\alpha$ 321, которые заключают аденин между фенольным кольцом Phe $\alpha$ 216 и алифатической частью боковой цепи Arg $\alpha$ 321

Оба эти основания строго консервативны в рамках II класса **синтетаз** и располагаются в мотивах 2 к 3, соответственно. По мере формирования комплекса PheRS-Phe-AMP аргинин движется в область непосредственного контакта с адениновым кольцом. **Адениновая** часть **интермедиата** образует дополнительные водородные связи между N6 и N1 кольца, с одной стороны, и **Glu $\alpha$ 206** и атомами основной цепи **Glu $\alpha$ 213** - с другой.

Две молекулы воды завершают картину взаимодействий, стабилизирующих положение **аденина** в активном сайте белка. Вода S208 опосредует взаимную **тетра-координацию** между карбонильным кислородом основной цепи **Gly $\alpha$ 318**, амидным азотом Arg $\alpha$ 321, 2'-гидроксильной группой рибозы и азотом N3 аденина. **Гуанидиновая** группа инвариантного среди всех синтетаз II класса **Arg $\alpha$ 204** связывается с N7 аденина через молекулу воды S289.

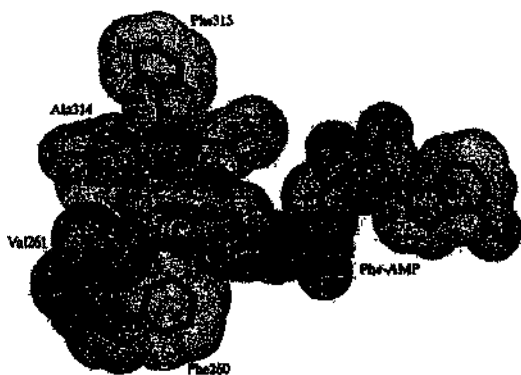


Рис. 4. Стерические ограничения при связывании **аденилата** в активном сайте PheRS

Среди двадцати природных аминокислот лишь три (Phe, Trp, Tyr) обладают крупными ароматическими боковыми цепями, так что только **Trp** и **Tyr** могут рассматриваться, как потенциальные конкуренты **фенилаланина**

при связывании в активном сайте PheRS. Однако, связыванию тирозина и триптофана препятствуют, жесткие **стерические** ограничения (Рис. 4) и гидрофобная природа задней стенки связывающего аминокислоту «пакета», образованной аминокислотами Vala261 и Alaα314.

Атом марганца, обладающий низким ( $31,3 \text{ \AA}^2$ ) В-фактором, располагается в области взаимодействия субъединиц, в «**туннеле**», образованном несколькими полярными аминокислотами, и координируется боковыми цепями Asp452, Aspβ458, Glu461, Gluβ462 и Asnpl63, принадлежащими к р-субъединице, и боковой цепью Gluα262 (**α-субъединица**). Положение металла в области взаимодействия субъединиц **гетеродимера**, поблизости от активного сайта, подчеркивает его критическую роль в стабилизации структуры белка и его функционировании. Катион усиливает связь субъединиц и координирует их электростатические взаимодействия, упорядочивает фенилаланин-связывающую петлю (255-263), в состав которой входят, например, Pheα258 и Pha260, взаимодействующие с субстратом.

Два аминокислотных остатка - Argβ407 и Argβ413, - участвующие в связывании сульфата, структурно принадлежат к домену B5. Архитектура этого домена сходна с **ДНК-связывающим** доменом белка-активатора **катаболитного** гена. Вдобавок, сравнение структуры PheRS из *Th. thermophilus* с биотин-синтетазой (BirA) из *E. coli* демонстрирует большое сходство между доменом B5 и ДНК-связывающим доменом BirA. Эти структурные аналогии позволяют провести параллели между их **функциями**, предположив участие PheRS в **регуляторных** процессах и специфическом связывании с ДНК. Ряд исследований **ДНК-связывающей** активности PheRS подтверждают эту гипотезу. Высоко упорядоченный сульфат может рассматриваться как составная часть интерфейса взаимодействия **PheRS–ДНК** и, видимо, играет

ключевую роль в распознавании **нуклеотидов ДНК**, удерживая боковые цепи двух аргининов в оптимальном для контакта положении.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучение пространственных структур комплексов PheRS с различными лигандами (PheRS-Phe-AMP, PheRS-tRNA<sup>Phe</sup>, PheRS-Phe, PheRS-AMP), анализ первичных структур синтезат из различных биологических источников и результатов биохимических исследований, позволяют нам попытаться описать молекулярный механизм активации **фенилаланина** и конформационные перестройки, которые претерпевает 3'-конец tRNA<sup>Phe</sup>, взаимодействуя с белком, в активном центре которого присутствует **фенилаланил-аденилат**.

В фенилаланиновой системе негативный заряд карбонильного кислорода аминокислоты в переходном состоянии нейтрализуется тремя позитивно заряженными полярными аминокислотами - Arg $\alpha$ 204, His $\alpha$ 178 и Gln $\alpha$ 218. В этот же процесс, видимо, вовлечен и Trp $\alpha$ 149. На карте аномальной электронной плотности не было обнаружено отчетливых источников аномального рассеяния в активном центре, что говорит об отсутствии в нем ионов металла, так что можно предположить, что либо формирование Phe-AMP возможно в отсутствии **дивалентных** катионов, либо катионы высвобождаются, как только формирование **аденилата** заканчивается.

В активном сайте PheRS роль иона металла (**электрофильного** катализатора реакции) распределена между аминокислотой Trp $\alpha$ 149 и молекулой воды S290. В то же время, оптимально для электростатического взаимодействия с «принципиальным ионом» металла - то есть, образуя соединение между а- и р-фосфатами АТФ, - в PheRS расположены Gly $\alpha$ 282 и Glu $\alpha$ 279 (вовлеченный в опосредованные водой взаимодействия с Arg $\alpha$ 252).

Таким образом, АТФ в паре с катионом металла запускают **конформационные** изменения, разрушающие кластер полярных аминокислот, связанных с водой S195 (Arg $\alpha$ 252, Gln $\alpha$ 254, Gln $\alpha$ 266, Glu $\alpha$ 279), и боковые цепи Glu $\alpha$ 279 и Gln $\alpha$ 266, переориентированные по направлению к субстрату, участвуют в октакоординации **дивалентного** иона.

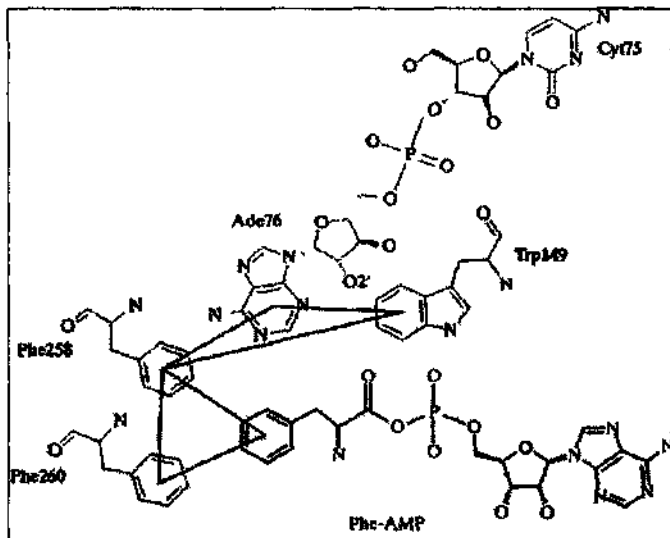


Рис. 5. Схематическое изображение сети взаимодействий в активном сайте комплекса PheRS-Phe-AMP-тРНК<sup>Phe</sup>

*Две **ароматические** «триады», внутри которых кольца взаимодействуют по механизму «ребро-плоскость», обозначены треугольниками.*

Но для успешного прохождения реакции необходима и перестройка терминального **аденозина** тРНК: видимое на структуре PheRS-тРНК положение Ade76 перекрывается с позицией **фенилаланина** в комплексе и с Phe-AMP. Таким образом, PheRS первоначально связывает аминокислоту и

АТФ, и только затем взаимодействует с тРНК. Присутствие интермедиата способствует корректному связыванию тРНК и ориентации терминального аденозина, который стабилизируется тремя водородными связями. Фенильные кольца Phe $\alpha$ 258 и Phe $\alpha$ 260 также переориентируются.

Способ одновременного размещения в активном сайте и Phe-AMP, и 3'-конца tRNA<sup>Phe</sup> показан на рисунке 5. В комплексе PheRS-tRNA<sup>Phe</sup> терминальный аденозин, проникая в фенилаланин-связывающий «пакет», входит в сеть взаимодействующих колец, вместе с Phe $\alpha$ 258 и Phe $\alpha$ 260. В случае же комплекса PheRS-Phe-AMP он взаимодействует с Phe $\alpha$ 258 и Trp $\alpha$ 149. Таким образом, фенилаланин из Phe-AMP и окружающие его остатки Phe $\alpha$ 258 и Phe $\alpha$ 260 формируют одну ароматическую «триаду», тогда как Ade76 совместно с Phe $\alpha$ 258 и Trp $\alpha$ 149 - вторую. Две соседствующие триады, в свою очередь, вместе образуют шестичленную сеть взаимодействий, энергетически весьма выгодную и стабилизирующую переходный комплекс PheRS-Phe-AMP-tRNA<sup>Phe</sup>, ориентируя реактанты оптимальным для второго этапа реакции способом.

На втором этапе реакции 2'-ОН группа рибозы терминального основания Ade76 атакует карбонильный атом углерода интермедиата Phe-AMP. При этом белковая аминокислота Trp $\alpha$ 149 расположена так, что способна катализировать их взаимодействие. Более глубокий анализ стереохимических параметров реакции **аминоацилирования** будет возможен после установление пространственной структуры тройного комплекса PheRS с тРНК<sup>Phe</sup> и Phe-AMP или его не гидролизуемыми аналогами.

## ВЫВОДЫ

1. Показано, что для **фенилаланил-тРНК-синтетазы** из *Thermusthermophilus* роль катализатора реакции способен выполнять марганец. Замена  $Mg^{2+}$  на  $Mn^{2+}$  позволяет проводить первую стадию **аминоацилирования** в присутствии сульфата аммония, строго необходимого для сохранения кристаллов PheRS.

2. Получены кристаллы комплекса фенилаланил-тРНК-синтетазы с продуктом первой фазы реакции, **фенилаланиладенилатом**. Рентгено-структурные данные подтвердили возникновение комплекса **PheRS-Phe-AMP**.

3. Пространственная структура комплекса определена при разрешении до 2,6 Å. Показано, что узнавание фенольной части **Phe-AMP** обусловлено взаимодействием фенольного кольца с аминокислотами активного центра, **Phe $\alpha$ 258** и **Phe $\alpha$ 260**, а также **стерическими** особенностями **субстрат-связывающего** «пакета».

4. В активном сайте не обнаружено ионов марганца; их роль в стабилизации необходимого для реакции переходного состояния АТФ выполняют полярные аминокислоты и молекулы воды. Расчет аномальной карты показал присутствие металла на интерфейсе субъединиц белка, вблизи от консервативного мотива 3, участвующего в формировании комплекса. На поверхности белка обнаружен анион  $SO_4^{2-}$ , который может служить одним из медиаторов взаимодействия **синтетазы** с ДНК.

5. Предложена схема прохождения аминоацилирования для PheRS, в рамках которой связывание фенилаланина и АТФ, а также завершение первой фазы реакции образованием в активном центре **фенилаланил-аденилата** является необходимым для последующего взаимодействия с **тРНК<sup>Phe</sup>**. В рамках этого взаимодействия и образования комплекса **PheRS-Phe-AMP-тРНК<sup>Phe</sup>** расположение участников второй стадии реакции внутри активного центра стабилизируется образованием ароматических «триад».

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. Fishman R., Saforo M., Ankilova V., Moor N. Crystal structure at 2.6 Å resolution of phenylalanyl-tRNA synthetase complexed with phenylalanyl-adenylate in the presence of manganese ions. // National Synchrotron Light Source Activity Report, Brookhaven National Laboratory - 2000.
2. Fishman R., Ankilova V., Moor N., Saforo M. Structure at 2.6 Å resolution of phenylalanyl-tRNA synthetase complexed with phenylalanyl-adenylate in the presence of manganese. // Acta Cryst. - 2001. - Vol. D57. - P. 1534-1544.
3. Фишман Р., Ильинская О., Сафро М. Выделение и очистка фенилаланил-тРНК-синтетазы из *Thermus thermophilus*. II «Материалы и технологии XXI века» П Научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра КГУ. Тез. докл. Казань, 2001. - С.96.
4. Фишман Р., Ильинская О., Сафро М. Фенилаланил-трнк-синтетаза из *Thermus thermophilus* в комплексе с функциональными лигандами. // III Съезд биохимического общества. Тез. докл. Санкт-Петербург, 2002. - С.527-528.